

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年3月20日 (20.03.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/022043 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A01K 67/027, C12N 5/06 市 都筑区早濑 2-2-1 株式会社資生堂リサーチセンター (新横浜)内 Kanagawa (JP). 常長 誠 (TSUNENAGA, Makoto) [JP/JP]; 〒224-8558 神奈川県 横浜市 都筑区早濑 2-2-1 株式会社資生堂リサーチセンター (新横浜)内 Kanagawa (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/09082
- (22) 国際出願日: 2002年9月6日 (06.09.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (74) 代理人: 小田島 平吉, 外(ODAJIMA, Heikichi et al.); 〒107-0052 東京都港区 赤坂 1丁目9番15号 日本自転車会館 小田島特許事務所 Tokyo (JP).
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): CN, KR, US.
- (30) 優先権データ:
特願2001-270100 2001年9月6日 (06.09.2001) JP (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社資生堂 (SHISEIDO COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒104-8010 東京都中央区 銀座七丁目5番5号 Tokyo (JP). 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 出田 立郎 (IDETA, Ritsuro) [JP/JP]; 〒224-8558 神奈川県 横浜 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HAIR FOLLICLE-RECONSTITUTION SYSTEM AND ANIMAL CARRYING THE SAME

(54) 発明の名称: 毛包再構成系およびその担持動物

(57) Abstract: A model animal carrying hair follicles which have been reconstituted by using hair papilla cells, epidermal cells and melanocytes being foreign to these cells. This model animal is usable in evaluating factors affecting hair growth and hair color.

(57) 要約:

毛乳頭細胞および表皮細胞と、これらの細胞に対して外来のメラノサイトとを用いて再構成された毛包を担持する実験動物が提供される。このような実験動物は発毛および毛の色の濃淡に影響を及ぼす要因を評価するのに使用できる。

WO 03/022043 A1

BEST AVAILABLE COPY

明 細 書

毛包再構成系およびその担持動物

5 技術分野

本発明は、毛包再構成系を担持する実験動物、ならびにその作出のための細胞系および使用に関する。

背景技術

特定の目的に向けられた動物反応を安定に再現することのできる多種多様のキメラ動物またはトランスジェニック動物は、主として、特定の疾患のモデルとして、または特定の疾患の病因を解明するために開発されている。例えば、毛髪再構成アッセイ用として、毛芽（特殊なケラチノサイト集塊として新生仔マウスの皮膚に存在する毛包前駆細胞）が、毛髪誘発性の毛乳頭細胞（ラットのヒゲ由来）と一緒に移植されたヌードマウスが開発されている（L i c h t i e t a l, J. I n v e s t D e r m a t o l 101:124-129, 1993）。

また、新生仔マウスの毛芽に由来する培養ケラチノサイトと毛乳頭細胞とが移植されたマウスでは、その移植領域の組織学的な解析により完全に組織化された上皮と毛包の再構成が確認されている（K a m i m u r a e t a l, J. I n v e s t D e r m a t o l 109:534-540, 1997）。かような再構成毛包は i n v i v o での毛髪の誘発についての信頼のおける機能性のアッセイに使用されうることが示唆されている。

他方、毛髪の誘発と相俟って言及することのできる事象として毛の色

調を上げることができるであろう。毛の色調は多くの場合、毛母細胞

(h a i r m a t r i x) の近傍に存在するメラノサイトによって産生され、毛を形成する細胞に与えられるメラニンによりもたらされるものとみなされている。白髪になるのは、かようなメラノサイトがメラニンを産生しなくなるか、メラニンを産生しても極めて少量であるか、またはメラノサイトが減少ないしは消滅することが主要な原因であるといわれている。しかし、毛周期に関連して考慮する場合、退行期（毛の増殖が止まり、毛包の短縮および棍毛の形成）および休止期を通じて毛包から激減または消失したメラノサイトは、次期成長期においてどのように補充され、そして毛の色調を整えることができるのか（どこから来るのか）、等については明らかでない。

したがって、毛の色調を整えることのできる手段、換言すれば、ある一定の手段が白髪の防止もしくは抗白髪作用を奏するか否かを評価できるイン・ビボの評価系を提供することは価値があろう。こうして、本発明の目的は、かかる評価系を提供することにある。なお、本明細書にいう、「抗白髪性」または「抗白髪作用」とは、例えば、メラノサイトの増殖促進、遊走能力促進、分化能促進、生存能力の増進、メラニン産生能等からなる群より選ばれる一種以上の活性で評価できる白髪化を抑制しうる特性であり、毛の色によりそれらの活性が示される性質を意味する。

発明の開示

本発明者らは、上記目的を達成すべく検討してきたところ、上述の毛包の再構成が確認されている、所謂、再構成毛包が、同種または異種のいずれの外来のメラノサイトを加えても再構成でき、しかもこうして構

成された毛包のメラノサイトは活性な状態に維持できることを見出した。

したがって、本発明によれば、毛乳頭細胞および表皮細胞と、これらの細胞に対して外来のメラノサイトとの組み合わせからなる毛包を再構成するための系が提供される。

5 別の態様の本発明として、レシピエント動物に上記系が移植され、こうして再構成毛包を担持するキメラ動物が提供される。

また、別の態様の発明として、上記キメラ動物を被験動物として用意し、該被験動物をある一定の手段で処置し、こうして処置された被験動物の再構成毛包におけるメラノサイトの活性をモニターし、未処置対象
10 に対する該活性の変化の程度を該手段のメラノサイトの活性化能と関連付けることを特徴とする、ある一定の手段のメラノサイトの活性化能の評価方法も提供される。

図面の簡単な説明

図1は、例Ⅱ-2で作出されたキメラマウスの背部の状態を表す図面に代わる写真である。図中の数字は、それぞれ実験番号を表す。
15

図2は、例Ⅲにより数種の因子の作用下における本発明に従うキメラマウスの再生毛中のメラニン含量の変化を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本明細書において、「毛乳頭細胞(d e r m a l p a p i l l a e)」
20 (以下、DPという場合あり)は、本発明の目的に沿う限り、広く毛包最下部にある毛乳頭細胞およびその周辺の細胞および組織を包含する概念を表わすものとして使用されている。このような組織としては毛乳頭細胞を含有する真皮を挙げることができる。限定されるものでないが、このような細胞は、マウスに由来する細胞を例にすれば、パーシカンブ

ロモーターの下流に適当なレポーター遺伝子（例えば、L a c Z 遺伝子、
グリーン蛍光タンパク質（G F P）の構造遺伝子）をつないだ発現ベク
ターを導入したトランスジェニックマウス（V e r - L a c Z）から生
まれた新生仔（生後 4 日以内に使用）から、レポーター遺伝子の発現を
5 目印にして取得することができる。また、毛乳頭細胞を含有する真皮と
しては、皮膚から通常の調製方法によって取得される真皮が、一般に、
毛乳頭細胞を含むので、そのまま、本発明の毛乳頭細胞として使用する
こともできる。

他方、「表皮細胞」は、皮膚の表皮または上皮の大部分を構成する細
10 胞であり、真皮に接する 1 層の基底細胞から生じる。マウスを例にする
と、かような表皮細胞としては新生仔（もしくは胎児）に由来する表皮
細胞が好ましく使用できるが、ケラチノサイトの形態にある細胞の培養
物であってもよい。かような細胞は、それ自体公知の方法により所望の
ドナー動物の皮膚から調製することができる。

15 上記の毛乳頭細胞または毛乳頭細胞を含む真皮細胞と表皮細胞は、レ
シピエント動物に移植可能であれば、それらのドナー動物の種を問うこ
となく使用できるが、レシピエント動物と同種の動物に由来するものが
好ましい。限定されるものでないが、レシピエント動物がマウスである
場合、上記両細胞はいずれもマウス由来であることができ、他方、両細
20 胞が同じマウスの系統に由来するものでなくてもよい。したがって、毛
乳頭細胞または毛乳頭細胞を含む真皮細胞を、その確認が容易な上述の
いずれかのトランスジェニックマウス（例えば、V e r - L a c Z 系統）
から取得し、他方、表皮細胞を、例えば、アルビノ（チロシナーゼの遺
伝的欠陥を有する）の性質をもつ I C R 系統およびメラノサイト欠損系

統（例えば、 W^{s^b}/W^{s^b} マウス）からなる群より選ばれるマウスから取得したものを使用してもよい。本発明に従えば、かようなアルビノもしくはメラノサイト欠損の性質をもつ動物由来の表皮細胞の使用が、後述する外来のメラノサイトの挙動をより容易にモニターできるので好ましい。また、上記のトランスジェニックマウスもICR系統およびメラノサイト欠損系統からなる群より選ばれるマウス由来であることもできる。

本明細書の「外来のメラノサイト」における「外来」とは、毛乳頭細胞または表皮細胞の起源と起源が異なることを意味する。したがって、メラノサイトには、毛乳頭細胞または表皮細胞の起源と異種動物に由来するもののみならず同種同系統であっても毛乳頭細胞または表皮細胞を採取した個体と異なる個体に由来するものをも包含する。このことは、仮りに、毛乳頭細胞または表皮細胞調製物に生来のメラノサイトが混在する場合であっても、かようなメラノサイト以外の追加のメラノサイトが、目的の系に必ず含まれることを意味する。

しかし、限定されるものでないが、毛乳頭細胞または表皮細胞がマウス由来である場合、メラノサイトは、マウス以外の動物、例えばヒト由来であることが好ましい。このような好ましい組み合わせを用いると、再構成毛包において、メラノサイトの分化状態に関わりなくメラノサイトの分布をトレースすることができる（例えば、ヒトメラノサイトに対する抗体もしくはヒトに対する特異的抗体またはヒトの特異的遺伝子配列もしくはヒトメラノサイトの特異的遺伝子配列の使用）。本発明に従えば、毛乳頭細胞（マウス）、表皮細胞（マウス）およびメラノサイト（ヒト）からなる、所謂、キメラ再構成毛包において、メラノサイトがその活性（例えば、メラニン産生活性）を維持しうることに特徴があ

る。また、後述する評価方法においてはヒトメラノサイトに作用しうる手段を探索できる点も本発明に備わる特徴である。

本発明で用いることのできるメラノサイトは、本発明の目的に沿って、メラニン色素の産生能を有するものであれば、いかなる種の動物に由来するものであってもよいが、上記のような特徴を活かすには、上述のとおり、ヒト由来のメラノサイトが好ましい。メラノサイトは、適当な組織、例えば表皮、さらに包皮、等からそれ自体公知の方法で調製することができる。また、市販品を使用することもできる。例えば、ヒト由来の培養メラノサイトは、NHEM細胞の名称の下にC a s c a d e社またはクラボウ社等から入手できる。

他方、以上の毛乳頭細胞および表皮細胞は、上述のとおり、それらのレシピエント動物と同種の動物に由来するものが好ましく、本発明の目的上、かかる動物の具体的なものとしては、マウス、ラットを挙げることができる。

本発明の「毛包を再構成するための系」は、上記の毛乳頭細胞および表皮細胞と、外来のメラノサイトとの組み合わせからなる。かような「組み合わせからなる・・・系」とは、上記の各細胞を一体として含む場合だけでなく、将来一体として使用する目的で各細胞が個別に保存されるように、例えば、個別の容器に入れられている形態をも包含する意味を有する。したがって、それらが上記の系を再構成する目的で使用される限り、本発明の範囲内にある。また、「毛包を再構成する」とは、レシピエント動物において、発毛または育毛を支持しうる器官として役立つ再構成毛包（またはキメラ毛包）をもたらしうることを意味する。このような器官には、毛乳頭細胞、毛母細胞、毛包上皮系細胞・組

織（例えば、毛根鞘）、脂腺、毛包をとりまく結合組織等が含まれるであろう。

本発明に従う、上記の系は、適当なレシピエント動物に移植した場合に、再構成毛包を担持するキメラ動物を提供しうる。かかるキメラ動物は、毛包内に活性な（好ましくは、異種動物由来）メラノサイトを有するので、メラノサイトの機能またはメラノサイトの活性に影響を及ぼしうる手段（薬物および環境等を含む）の評価をする上で有用である。レシピエント動物は、該動物に移植される系に含まれる各細胞の起源に拘わりなく、免疫系が抑制された動物であることが好ましい。また動物種としては、実験動物として使用しうるものであり、本発明の目的に沿うものである限り、いかなる動物であってもよいが、好ましくは、マウス、ラット等を挙げることができる。このような動物のうち、免疫系が抑制されているものとしては、マウスを例にすれば、ヌードマウスのように、胸腺欠損のごとき形質をもつものが挙げられる。なお、本発明の目的を考慮すれば、特に好ましいレシピエント動物としては、市販のヌードマウス（例えば、B a l b - c n u / n u 系統）、スキッドマウス（例えば、B a l b / c - S C I D）、ヌードラット（例えば、F 3 4 4 / N J c l - r n u）を挙げることができる。このようなレシピエント動物を使用し、そして表皮細胞としてアルビノの性質を持つマウス（例えば、I C R 系統）またはメラノサイト欠損マウス（例えば、W^{sh} / W^{sh}）由来のものを使用して得られる再構成毛包は、該毛包に含まれるメラノサイトの活性のトレースが容易である点で特に好ましい。

本発明に従えば、上記のメラノサイトがヒト由来であっても、上記の特に好ましいレシピエント動物、表皮細胞を使用することによって、再

構成毛包からメラニン色素を含む毛が誘発および発育する。また、毛包の周辺領域にもメラニン色素の産生が観察できる。さらに、移植後6週目の毛の実体顕微鏡観察によると、その間に毛の色が、例えば灰色から白に変わることはなく、メラニンを産生するメラノサイトが長期間、再構成毛包に存在していることが確認されている。さらにまた、移植に際して、ヒト由来のメラノサイトの混合量が多いと毛の色が、一般に、濃くみえることから、再生された毛の色は毛乳頭細胞周囲のヒト由来のメラノサイトのメラニン産生量に依存するものとみなされる。

かような、本発明に従う、毛包を再構成するため系をレシピエント動物に移殖する方法は、それ自体公知の移殖方法によることができる。例えば、ヌードマウスの背部に該系を移殖する場合、その背部の直径約1 cmの円に対し、毛乳頭細胞は、約50万～1000万個、好ましくは約100万～約400万個、マウス表皮細胞は、約100万～4000個、好ましくは約1000万～約2000万個使用し、培養ヒトメラノサイト（DARK）は、約50万～1000万個、好ましくは、約100万個～500万個、使用することができる。

以上のような再構成毛包を担持するキメラ動物は、再構成毛包から、長期にわたってメラニンを含む毛を誘発し、そして育成しうるので、毛の成長および毛の色を濃くするのに関与する細胞もしくは組織、または器官、例えば、メラノサイト、毛乳頭、毛母細胞等が正常に働いているものとみなされる。したがって、本発明に従うキメラ動物は、

1) メラノサイトを活性化させることにより、毛の色を濃くする作用のある薬物のスクリーニング、

2) 毛乳頭を活性化させることにより、毛の成長を促し、毛全体の色

を濃くする作用のある薬物のスクリーニング、

3) 毛母細胞を刺激することにより毛の成長を促し、毛全体の色を濃くする作用のある薬物のスクリーニング、

4) 毛乳頭を刺激することにより毛包内のメラノサイトを活性化させ、

5 毛の色を濃くする作用のある薬物のスクリーニング、

5) 毛母細胞を刺激することにより毛包内のメラノサイトを活性化させ、毛の色を濃くする作用のある薬物のスクリーニング、

6) 上記の作用のうちいずれか、あるいは全体の組み合わせにより、毛の色を濃くする作用のある薬物およびその組み合わせ作用を有する薬物のスクリーニング、等に使用できる。なお、本発明に従うメラノサイトの活性化薬物または化学物質の範囲には、メラノサイトの成長、分化、増殖、生存、運動能力のうちいずれかまたは、いずれかの活性のうちいくつか、あるいはすべてを刺激し活性化することにより、毛の色を濃くする作用を持つ薬物であり、毛の色によりその活性が示されるものが
10 15 包含される。

このような使用態様に係る発明の一態様としては、

(A) 上述のキメラ動物を被験動物として用意する段階、

(B) 該被験動物をある一定の手段で処置し、こうして処置された被験動物の再構成毛包におけるメラノサイトの活性をモニターする段階、

20 (C) 未処置対象（例えば、段階（B）の処置を行っていない被験動物の再構成毛包におけるメラノサイトの活性）に対する段階（B）の活性の変化の程度を該手段によるメラノサイトの活性化能と関連付ける段階、

を含んでなるメラノサイトの活性化能の評価方法が挙げられる。

かような評価方法でメラノサイトの活性化能を、再構成毛包からの発毛のメラニン色素の多寡によって評価できる。また、発毛および毛の成長の程度により、毛乳頭、毛母細胞のいずれか一方または両方に、段階（B）の手段がいかに影響を及ぼしうるか、を評価できるであろう。か

5 ような手段としては、被験動物が置かれる環境、例えば、ストレス環境、それに対立するリラクセーションが図れる環境等、ならびに、被験動物の再構成毛包に塗布されるか皮下注入される薬物もしくはあらかじめメラノサイトを処理しておく薬物、あるいは経口投与される薬物を挙げる

10 ることができる。また、薬物は再構成毛包を担持するキメラ動物を作出する際に、上記の毛包を再構成するための系に添加してもよい。

また、上記メラノサイトの活性のモニターは、ヒト由来メラノサイトを使用して再構成毛包を確立した場合には、メラニン生合成経路のいずれかの酵素それら自体、またはそれらの酵素をコードするDNA、mRNA等について、それ自体公知のアッセイを使用して検出してもよい。

15 別法として、キメラ動物の毛を抜去もしくは剪毛した後、新たに生えてくるかまたは成長してくる毛、あるいは毛の周期を繰り返して新たに生じた毛におけるメラニン含量を測定してもよい。

以下、具体例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明の理解を容易にする目的で提供するものであり、本発明の範囲を限定

20 するものでない。

I. 各種細胞の調製例

例1：マウス由来毛乳頭細胞

(1-1) バーシカン (Versican) プロモーター下流に適当なマーカータンパク (例; LacZ) の構造遺伝子をつないだ発現ベク

ターを導入したトランスジェニックマウスから生まれた新生仔（生後4日以内に使用）のうち、LacZ陽性の個体を選別する。

- 5 (1-2) 各個体をエタノールと適当な洗浄液（例；リン酸緩衝生理食塩水。PBSと呼称）で洗浄後、背部皮膚を剥離し、0.25%トリプシン/PBS中で4℃下で一晩静置する。

(1-3) 翌日、ピンセットなどにより表皮と真皮を分離し、真皮側を0.35%コラゲナーゼ/DMEM（ダルベッコ変法イーグル最少培地。以下DMEMと呼称。）などにより37℃下で約1時間ほど処理する。

- 10 (1-4) (1-3)を念入りに懸濁操作を行なったのち、70μメーターのポアサイズを持つセルストレーナーに通し、次いで遠心分離器によって細胞を集める。

- 15 (1-5) 集めた細胞を適当なセルソーターを用いて、LacZ遺伝子の発現した細胞のみ回収し、適当な培養液（例；DMEMに10%のウシ胎児血清（FBSと呼称））で培養するか、使用前日まで通常の細胞凍結溶液で凍結保存する。

(1-6) 使用前日までに細胞を適当な培養条件（例；DMEM+10%中で5%CO₂存在下、37℃など）におき、翌日手術直前にトリプシンなどにより調製する。

20 例2：マウス由来表皮細胞

(2-1) 手術前日、アルビノの性質を持つマウス（例；ICR系統）の新生仔より（1-1）、（1-2）と同様の方法により皮膚をトリプシン処理する。

(2-2) ピンセットなどにより表皮部分のみ剥離し、細切後、適当

な培養液（例；ケラチノサイト用培養液、以下KGMと呼称。）中で4℃で約1時間懸濁処理する。

（2-3） 70μメートルのポアサイズを持つセルストレーナーを通した（2-2）を遠心分離器にかけて表皮細胞を回収する。

- 5 （2-4） レシピエント動物1個体あたり、2匹の新生仔由来に相当する量の表皮細胞を手術に用いる。相当量の細胞をKGMで懸濁して、使用直前まで氷上に静置する。また、回収した細胞は凍結保存した後、使用前に解凍して用いることもできる

例3：マウス由来真皮細胞

- 10 （3-1） 手術前日、アルビノの性質を持つマウス（例；ICR系統）の新生仔より（1-1）、（1-2）と同様の方法により皮膚をトリプシン処理する。

- （3-2） ピンセットなどにより表皮部分を剥離し、残った真皮を細切後、0.35%のコラゲナーゼを含んだ適当な培養液（例；DMEM
15 +1.0%FBSなど）中で37℃で約1時間懸濁処理する。

（3-3） 100μメートルのポアサイズを持つセルストレーナーを通した（2-2）を遠心分離器にかけて真皮細胞を回収する。

- 20 レシピエント動物1個体あたり、2匹の新生仔由来に相当する量の真皮細胞を手術に用いる。これと単離毛乳頭細胞を同時に用いることは無い。相当量の細胞をDMEM+1.0%FBSなどで懸濁して、使用直前まで氷上に静置するか、または凍結保存する。

例4：ヒト由来培養メラノサイト

（4-1） 市販の包皮由来メラノサイトを（例；Cascade社の販売している、NHEM細胞など。）メラノサイト用培養液（例Cas

c a d e社のM154s培地など)で培養する。手術当日までにレシピエント動物1個体あたり50万から1000万個に相当する量まで増殖させる。

- (4-2) 使用直前に、0.05%トリプシン処理により培養器からはがし、培養液中に懸濁して、使用直前まで氷上に放置する。

例5：マウス由来メラノサイト

- (5-1) 手術一週間以上前に新生仔マウス(実施例においては、C57Black/6系統を使用)より(1-1)、(1-2)に準ずる方法により皮膚を単離し、トリプシン処理する。

- 10 (5-2) 表皮を剥離後、0.02%EDTAを含んだPBS中に剥離表皮を浮かべる。

(5-3) 穏やかに混合した後、37℃中で約8分間振とうする。

- (5-4) 70μメートルのセルストレーナーに通した後、細胞を遠心分離器により回収し、メラノサイト用の培養液中で培養する。培養条件は、細胞の状態による。

(5-5) 使用直前に、0.05%トリプシン処理により培養器からはがし、培養液中に懸濁して、使用直前まで氷上に放置するか、または凍結保存する。

II. 毛包再構成方法(動物への移植方法)

- 20 例II-1：マウス由来毛乳頭細胞を用いる場合

用意するもの；下記II-(1-1)、(1-2)、(1-3)を適当量混合し、「再構成毛包作成手順」の「細胞懸濁液」として用いる。

II-(1-1) Versicanプロモーター下流に適当なマーカータンパク(例；LacZ)の構造遺伝子をつないだ発現ベクターを導入

したトランスジェニックマウスの新生仔真皮から調製した毛乳頭細胞（Dermal Papilla；以下DPと呼称）。再構成手術を行なう前日以前に調製し、手術当日にトリプシン処理により回収する。

5 II-（1-2） マウス由来表皮細胞。手術前日、アルビノの性質を持つマウス（例；ICR系統）の新生仔より、皮膚を採取し、手術当日トリプシン処理により調製。こうして調製された細胞は凍結保存後に使用することもできる。

II-（1-3） 培養メラノサイト。（AまたはBを用いる）

10 A. ヒト由来メラノサイト。市販の包皮由来メラノサイトを継代培養したもの（例；Cascade社の販売している、NHEM細胞など）。手術当日トリプシン処理により調製。こうして調製された細胞は凍結保存後に使用することもできる。

15 B. マウス由来メラノサイト。新生仔マウス（実施例においては、C57Black／6系統を使用。）より手術一週間以上前に単離し、培養系に移して継代培養したもの。手術当日トリプシン処理により調製。こうして調製された細胞は凍結保存後に使用することもできる。

例II-2：マウス真皮を用いる場合

20 前記II-（1-1）に変わり、手術前日アルビノの性質を持つマウス（例；ICR系統）の新生仔より、皮膚を採取し、手術当日コラゲナーゼ処理により調製したものをを用いて「細胞懸濁液」を作成する。こうして調製された細胞懸濁液は凍結保存後に使用することもできる。

<再構成毛包作成手順>

用意するもの：

レシピエント動物（例；Balb-c nu／un系統ヌードマウス。

5 週齢以上)、

シリコン製の直径 1 センチ程度のドーム状キャップ (以下バルブと呼称)、

麻酔薬、

5 手術用ハサミ、ピンセット、縫合器

マイクロピペッター

「細胞懸濁液」：メラノサイト、表皮細胞、真皮細胞あるいは毛乳頭細胞からなる。各細胞の調製方法は上述参照。細胞を培養液 (DMEM + 10% FBS など) 約 150 μ l 程度に懸濁し氷上に静置したものまたは凍結保存したものから手術直前に調製する。

<手順>

- (i) ノードマウスを麻酔。
- (ii) 背部皮膚を直径 1 センチ弱に切り取る。
- (iii) 傷口にバルブを挿入し、縫合器で固定する。
- 15 (iv) バルブ内に、細胞懸濁液をピペッターを用いて注入する。
- (v) そのまま約 1 週間飼育し、バルブをはずす。
- (vi) 1~2 週間後、かさぶたが取れた跡に、再構成毛包の生育を観察することができ、メラノサイトを懸濁液に入れた場合には、本来アルビノの純白の毛色であるはずが灰色に変色することを観察できる。
- 20 (vii) この毛色がメラニン色素由来であることは、組織学的観察により明確にされる。

結果

以上、上記の各細胞および上記の手順に準じて作出した再構成毛包担持動物の具体的な条件 (毛包を再構成するための系; +印が含まれる細

胞である。) および毛の色および移植皮膚色について下記表-1にまとめて記載する。また、実験番号2、5、6、7、8および10で作出された動物の背部の状態を表す図面に代わる写真を図1として添付する。

5

10

15

20

表-1

実験番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ヒト皮膚培養色素細胞(dark-skin)	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	
ヒト皮膚培養色素細胞(light-skin)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-		
ヒト毛包由来培養色素細胞(アジア人)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-		+
マウス皮膚培養色素細胞(C57/black)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		
真皮細胞(ICRアルビノマウス)	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-		
表皮細胞(ICRアルビノマウス)	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-		
真皮細胞(W^{bb}/W^{bb} マウス)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+		
表皮細胞(W^{bb}/W^{bb} マウス)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
マウス単離毛乳頭細胞	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+
再構成毛の毛色	無毛	白色毛	白色毛	白色毛	灰色毛	灰色毛	灰色毛	灰色毛	灰色毛	灰色毛	灰色毛	灰色毛

例Ⅲ 抗白髪性薬物の評価

例Ⅱ－２の＜手順＞に従い実験番号７の毛包を再構成するための系をヌードマウスへ移植し、約３～４週後に再構成された毛を抜去した。抜去後、それぞれ、幹細胞因子（以下、SCFと略記する）、 α -メラニン細胞刺激ホルモン（以下、MSHと略記する）、およびp-アミノ安息香酸（以下、PABAと略記する）を含有する溶液（それぞれ、動物の体重１g当たり、SCFの３０ ng、MSHの１ pmol、およびPABAの５０ ng）、またはリン酸緩衝溶液（PBS：比較）を動物の皮下に毎日注射し、これを１週間繰り返した。

その後、再び再生される毛が十分成長した後（約３週間後）、再生毛を剪みにより刈り取り集めた。毛を溶解後、吸光度によりメラニン含量を定量した。結果を図２に示す。図より、各種因子の添加により再生毛中のメラニン含量が有意に増加することがわかる。したがって、本発明のキメラ動物は、少なくとも抗白髪性薬物のスクリーニングに使用できる。

産業上の利用可能性

本発明によれば、抗白髪性薬物のスクリーニングに適する安定した表現型を有するキメラ動物が提供できる。したがって、実験動物供給産業、該動物を用いて、例えば有効な抗白髪性薬物を開発する医療業、化粧品製造業等で、本発明は利用可能である。

請 求 の 範 囲

1. 毛乳頭細胞または毛乳頭細胞を含む真皮細胞および表皮細胞と、
これらの細胞に対して外来のメラノサイトとの組み合わせからなる毛包
5 を再構成するための系。
2. 外来のメラノサイトが毛乳頭細胞または毛乳頭細胞を含む真皮細胞および表皮細胞とは異種の起源に由来する請求項 1 記載の系。
3. 外来のメラノサイトがヒト由来であり、そして毛乳頭細胞または毛乳頭細胞を含む真皮細胞および表皮細胞が同一種の同一または異なる
10 動物系統に由来し、かつ、該動物がマウス、ラットからなる群より選ばれる請求項 1 記載の系。
4. 外来のメラノサイトがヒト由来であり、毛乳頭細胞を含む真皮細胞が I C R 系統のアルビノマウスおよびメラノサイト欠損系統のマウスからなる群より選ばれるマウス由来であり、そして表皮細胞が I C R 系統のアルビノマウスおよびメラノサイト欠損系統のマウスからなる群より
15 選ばれるマウス由来である請求項 1 記載の系。
5. 外来のメラノサイトがヒト皮膚培養色素細胞であり、毛乳頭細胞または毛乳頭細胞を含む真皮細胞がマウス単離毛乳頭細胞、I C R アルビノマウス由来の真皮細胞および W^{sh}/W^{sh} マウス由来の真皮細胞から
20 なる群より選ばれ、そして表皮細胞が I C R アルビノマウス由来の表皮細胞および W^{sh}/W^{sh} マウス由来の表皮細胞からなる群より選ばれる請求項 1 記載の系。
6. レシピエント動物に、毛乳頭細胞または毛乳頭細胞を含む真皮細胞および表皮細胞と、これらの細胞に対して外来のメラノサイトとの組

み合わせからなる毛包を再構成するための系が移植され、こうして再構成毛包を担持することになったキメラ動物。

7. レシピエント動物が免疫系の抑制された動物であり、外来のメラノサイトがヒト由来である請求項6記載のキメラ動物。

5 8. レシピエント動物がヌードマウス、スキッドマウス、ヌードラットからなる群より選ばれる免疫系が抑制された動物である請求項6記載のキメラ動物。

9. レシピエント動物がヌードマウスであり、外来のメラノサイトがヒト由来であり、毛乳頭細胞を含む真皮細胞がICR系統のアルビノマウスおよびメラノサイト欠損系統のマウスからなる群より選ばれるマウス由来であり、そして表皮細胞がICR系統のアルビノマウスおよびメラノサイト欠損系統のマウスからなる群より選ばれるマウス由来である請求項6記載のキメラ動物。

10

10. レシピエント動物がヌードマウスであり、外来のメラノサイトがヒト皮膚培養色素細胞であり、毛乳頭細胞または毛乳頭細胞を含む真皮細胞がマウス単離毛乳頭細胞、ICRアルビノマウス由来の真皮細胞および W^{sh}/W^{sh} マウス由来の真皮細胞からなる群より選ばれ、そして表皮細胞がICRアルビノマウス由来の表皮細胞および W^{sh}/W^{sh} マウス由来の表皮細胞からなる群より選ばれる請求項6記載のキメラ動物。

15

20 11. レシピエント動物に、毛乳頭細胞または毛乳頭細胞を含む真皮細胞および表皮細胞と、これらの細胞に対して外来のメラノサイトとの組み合わせからなる毛包を再構成するための系が移植され、こうして再構成毛包を担持することになったキメラ動物を被験動物として用意し、該被験動物をある一定の手段で処置し、こうして処置された被験動物の

再構成毛包におけるメラノサイトの活性をモニターし、未処置対象に対する該活性の変化の程度（または差異）を該手段によるメラノサイトの活性化能と関連付けることを特徴とする、ある一定の手段のメラノサイトの活性化能の評価方法。

- 5 1 2. メラノサイトがヒト由来であり、メラノサイトの活性の変化の程度が再構成毛包からの毛髪または該毛包近傍の表皮におけるメラニン色素量の多寡により決定される請求項 1 1 記載の評価方法。

1 3. メラノサイトの活性化能が抗白髪性を評価するために検出される請求項 1 1 記載の評価方法。

- 10 1 4. 該手段が化学物質または薬物である請求項 1 1 記載の評価方法。

1 5. 請求項 1 1 に記載の評価方法でメラノサイトの活性化能を向上しうると評価された薬物を有効成分とする抗白髪剤。

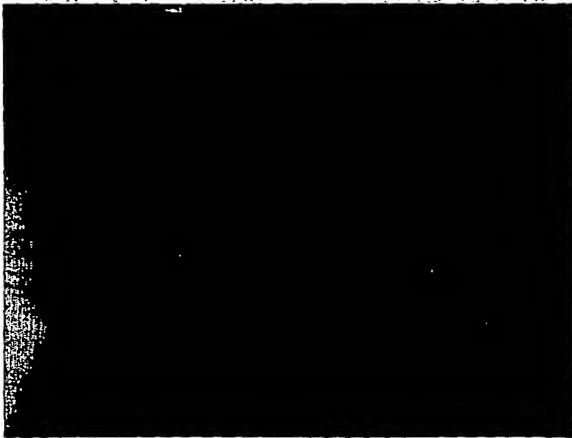
15

20

Fig.1



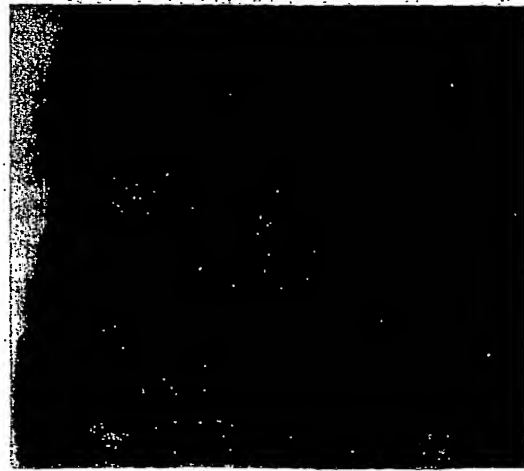
2



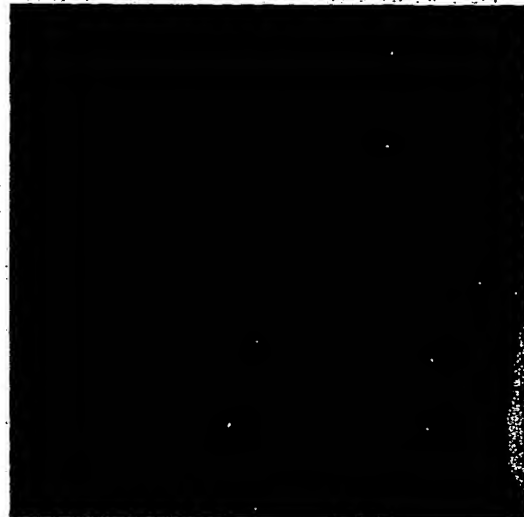
5



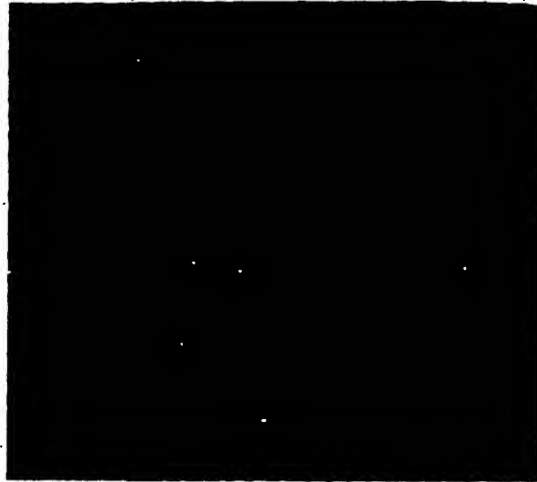
6



7

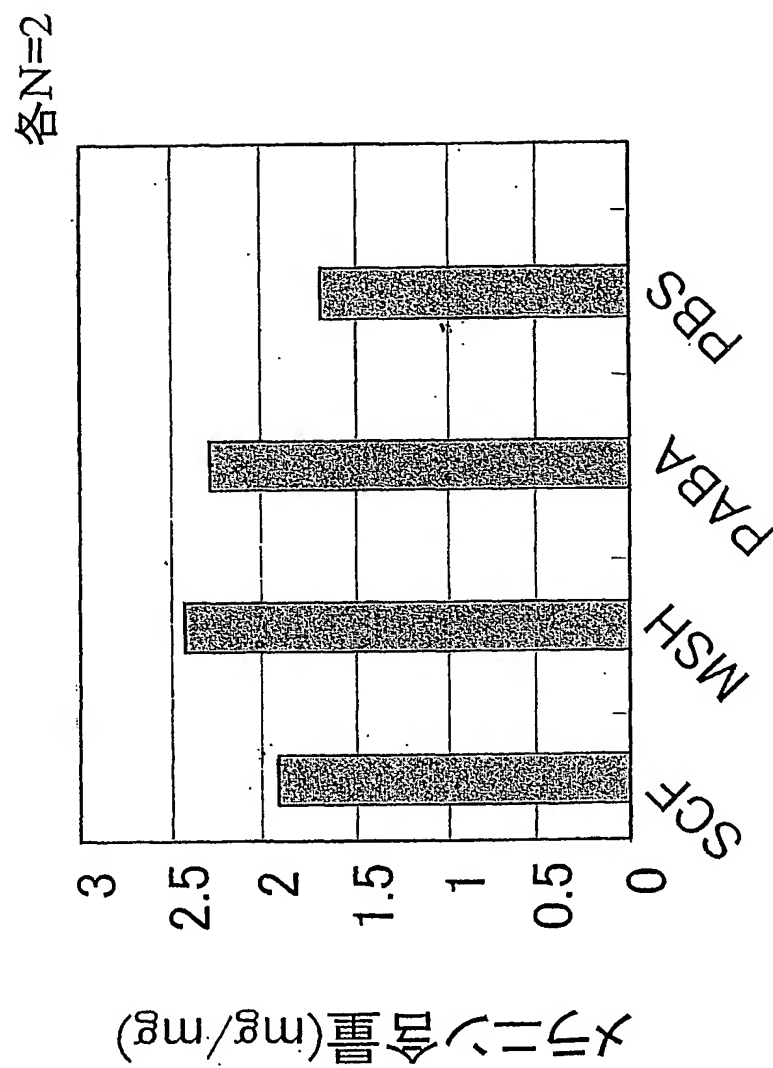


8



10

Fig. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09082

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01K67/027, C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01K67/027, C12N5/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), EMBASE (STN), SCISEARCH (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JICST-EPLUS (STN), CAPLUS (STN), MELANOCYTE?, HAIR(W) FOLLICLE?, SKIN(W) GRAFT?

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 99/45770 A1 (The Board of Trustees of The Leland Stanford Junior University), 16 September, 1999 (16.09.99), Pages 10 to 11, 22 to 23, 25, 34 to 37 & AU 3068699 A & EP 1063882 A1 & US 2001/48917 A1 & JP 2002-505859 A	1, 6, 7, 8 2-5, 9-14
X A	ROSENBERG A.S. et al., Evidence That The Effector Mechanism of Skin Allograft Rejection is Antigen-Specific., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1988, Vol.85, No.20, pages 7739 to 7742	1, 6, 7, 8 2-5, 9-14
A	KAMIMURA J. et al., Primary Mouse Keratinocyte Cultures Contain Hair Follicle Progenitor Cells with Multiple Differentiation Potential., J.Invest. Dermatol., 1997, Vol.109, No.4, pages 534 to 540	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 November, 2002 (26.11.02)Date of mailing of the international search report
10 December, 2002 (10.12.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09082

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TOBIN D.J. et al., Isolation and Long-Term Culture of Human Hair-Follicle Melanocytes., J.Invest. Dermatol., 1995, Vol.104, No.1, pages 86 to 89	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09082

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 15
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Concerning the "anti-gray hair agent" as claimed in claim 15, a large amount of trials and errors are needed beyond the reasonable extent that can be expected from a person skilled in the art to screen and identify all compounds to thereby understand the extent (continued to extra sheet)
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 14 are inventions having as a special technical feature "a system for reconstituting hair follicles".

The invention as set forth in claim 15 is an invention having as a special technical feature "an anti-gray hair agent".

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09082

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

of specific compounds involved therein. Thus, the "anti-gray hair agent" as claimed in claim 15 is not fully supported by the description.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ A 01 K 67/027, C 12 N 5/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ A 01 K 67/027, C 12 N 5/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), EMBASE (STN), SCISEARCH (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JICST-EPLUS (STN), CAPLUS (STN)
MELANOCYTE?, HAIR(W) FOLLICLE?, SKIN(W) GRAFT?

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 99/45770 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 1999.09.16, p.10-11, p.22-23, p.25, p.34-37, & AU 3068699 A & EP 1063882 A1 & US 2001/48917 A1 & JP 2002-505859 A	1, 6, 7, 8 2-5, 9-14
X A	ROSENBERG A.S., et al., Evidence That The Effector Mechanism of Skin Allograft Rejection Is Antigen-Specific.; Proc.Natl. Acad.Sci.USA, 1988, Vol.85, No.20, p.7739-7742	1, 6, 7, 8 2-5, 9-14
A	KAMIMURA J., et al., Primary Mouse Keratinocyte Cultures	1-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.11.02

国際調査報告の発送日

10.12.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉田 佳代子

2 B

9 5 1 6

電話番号 03-3581-1101 内線 6493

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Contain Hair Follicle Progenitor Cells with Multiple Differentiation Potential., J. Invest. Dermatol., 1997, Vol.109, No. 4, p.534-540	1-14
	TOBIN D.J., et al., Isolation and Long-Term Culture of Human Hair-Follicle Melanocytes., J. Invest. Dermatol., 1995, Vol. 104, No.1, p.86-89	

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 15 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲15に記載された「抗白髪剤」について、具体的にどのような化合物が含まれるのか、全ての化合物についてスクリーニングして確認することは、当業者に期待し得る程度を超える試行錯誤を求めるものである。したがって、請求の範囲15に記載された「抗白髪剤」は、明細書により十分に裏付けられていない。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-14に記載された発明は、「毛包を再構成するための系」を特別な技術的特徴とする発明である。

請求の範囲15に記載された発明は、「抗白髪剤」を特別な技術的特徴とする発明である。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.